

04.12.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

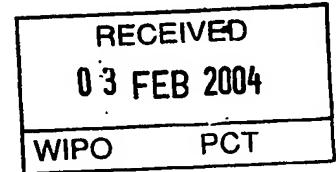
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 2 月 9 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 3 5 6 8 4 4

[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 5 6 8 4 4]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社ミツカングループ本社

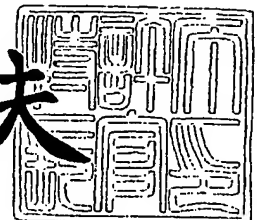


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫





【書類名】 特許願

【整理番号】 6639

【提出日】 平成14年12月 9日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県半田市青山 1 丁目 7 番地の 3

【氏名】 後藤 英嗣

【特許出願人】

【識別番号】 398065531

【住所又は居所】 愛知県半田市中村町 2 丁目 6 番地

【氏名又は名称】 株式会社 ミツカングループ本社

【代理人】

【識別番号】 100075775

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 親男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067287

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【包括委任状番号】 9900374

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酢酸菌の温度耐性向上遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の（A）、又は（B）に示すタンパク質GCS。

（A）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（B）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質。

【請求項2】 下記の（A）、又は（B）に示すタンパク質GCSをコードする遺伝子のDNA。

（A）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

（B）配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質。

【請求項3】 下記の（a）、又は（b）に示すDNAである請求項2に記載の遺伝子のDNA。


（a）配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号73～1251からなる塩基配列を含むDNA。

（b）配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号73～1251からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項4】 請求項2、又は請求項3に記載のDNAの細胞内のコピー数が増幅されたことにより、温度耐性が増強された微生物。

【請求項5】 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする請求項4に記載の微生物。

【請求項6】 請求項4、又は請求項5に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を



生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

【請求項 7】 請求項 2、又は請求項 3 に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド pUCGCS (FERM BP-8217)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物に由来する温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子、このコピー数を増幅した微生物、特にアセトバクター属 (Acetobacter) 及びグルコンアセトバクター属 (Gluconacetobacter) に属する酢酸菌、及びこれらの微生物を用いて高温環境下においても食酢を効率良く製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

酢酸菌は食酢製造に広く利用されている微生物であり、特にアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌が工業的な酢酸発酵に利用されている。

酢酸発酵では、培地中のエタノールが酢酸菌によって酸化されて酢酸に変換され、その結果、酢酸が培地中に蓄積することになるが、その際、多量の発酵熱が発生し、その結果、そのまま放置した場合は、発酵液の温度が上昇することになる。

酢酸菌の発酵温度は通常 30℃前後が適温であるので、発酵液の温度を上昇させないように発酵液を冷却する必要があるが、その結果、冷却の為のエネルギーがかかることになる。

【0003】

そのため、酢酸発酵においては、より高い温度でも増殖能力や発酵能力が低下しないこと、すなわち温度耐性の強い酢酸菌を開発することが求められており、その一手段として、温度耐性を持った酢酸菌を自然界からスクリーニングすることによって温度耐性酢酸菌を検索することが試みられていた (例えば、非特許文献 1 参照)。

【0004】

しかし、酢酸菌の温度耐性遺伝子に関する知見は殆ど無く、酢酸菌の温度耐性を実用レベルで向上させうる機能を有するタンパク質をコードする新規な温度耐性遺伝子を取得し、また取得した温度耐性遺伝子を用いて、より強い温度耐性を有する酢酸菌を育種することが望まれていた。

【0005】

【特許文献1】

特開昭60-9488号公報

【0006】

【非特許文献1】

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)」, 44巻, 2901-2906, 1980年)

【0007】

【非特許文献2】

「トレンズ・イン・ジェネティックス (Trends in Genetics)」, 5巻, p. 185-189, 1989年

【0008】

【非特許文献3】

「アプライド・オブ・エンバイロメト・アンド・マイクロバイオロジー (Applied of Environment and Microbiology)」, 55巻, p. 171-176, 1989年

【0009】

【非特許文献4】

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)」, 52巻, p. 3125-3129, 1988年

【0010】

【非特許文献5】

「アグリカルチュラル・アンド・バイオリジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)」, 49巻, p.2091-2097, 1985年

【0011】

【非特許文献6】

「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry)」, 58巻, p.974-975, 1994年

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

以上のように、従来より酢酸菌の温度耐性を遺伝子レベルで解明し、高い温度耐性を有する実用酢酸菌の開発に成功した例は報告されていない。しかし、温度耐性にすぐれた酢酸菌が開発されれば、従来よりも高温度で酢酸発酵が行なわれ、冷却コストの軽減が可能となることから、本発明者は、再度、酢酸菌の温度耐性の向上を遺伝子レベルで解明することとした。

【0013】

そして本発明者は、各方面から検討した結果、温度耐性を実用レベルで向上させる機能を有するタンパク質をコードする新規な温度耐性遺伝子を取得し、また取得した温度耐性遺伝子を用いて、より強い温度耐性を有する酢酸菌を育種することが重要であるとの観点にたち、酢酸菌に属する微生物由来の温度耐性に関与する新規な温度耐性向上遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の温度耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の温度耐性を向上させる方法、さらに温度耐性が向上した酢酸菌を用いて、食酢を効率良く製造する方法を提供することを新規技術課題として新たに設定した。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、高温度下でも増殖し、発酵することができる酢酸菌には、他の微生物には存在しない特異的な温度耐性に関与する遺伝子が存在するとの仮説を立て、こうした遺伝子を用いれば、従来以上に微生物の温度耐性を向上させること

ができ、効率的な製造法を開発することが可能になるとの新規着想を得た。

【0015】

従来の温度耐性酢酸菌の取得方法は、酢酸菌の温度非感受性の変異株をスクリーニングする方法が一般的であった。

【0016】

しかし、このような方法では産業上有用な温度耐性遺伝子を見出すことは困難であると考え、鋭意検討した結果、本発明者は、酢酸菌から温度耐性遺伝子を見出す方法として、酢酸菌の染色体DNAライブラリーを構築し、この染色体DNAライブラリーを酢酸菌に形質転換し、通常寒天培地上で37℃下でしか生育できない株を、38℃の温度下でも生育可能にする遺伝子をスクリーニングすることによって取得する方法を開発した。

この方法によって、実際に食酢製造に用いられているグルコンアセトバクター属の酢酸菌から、温度耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な温度耐性遺伝子をクローニングすることに初めて成功した。

【0017】

得られた温度耐性遺伝子は、DDBJ/EMBL/Genbankにおいてホモロジー検索をした結果、根粒菌などで見出されているセラミドグルコシルトランスフェラーゼと称される一群のタンパク質と相同性を示しており、酢酸菌のセラミドグルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であると推定された。

【0018】

しかし、取得された酢酸菌のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、根粒菌などの他の微生物で見出されている既知のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子とは相同性がきわめて低くかったことから、他のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子とある程度似ているものの酢酸菌に特異的な新規タンパク質（タンパク質GCSということもある）をコードする新規遺伝子であることを見出した。

【0019】

さらに、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、温度耐性が

が顕著に向上することなどを見出し、更に該タンパク質のアミノ酸配列、およびそれをコードする遺伝子DNAの塩基配列の決定にも成功し、本発明を完成するに至った。

【0020】

すなわち本発明は、下記の(1)～(9)を、実施態様の例として、提供するものである。

(1) 下記の(A)、又は(B)に示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質。

【0021】

(2) 下記の(A)、又は(B)に示すアミノ酸をタンパク質をコードする新規遺伝子のDNA。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質。

【0022】

(3) 下記の(a)、又は(b)に示すDNAである上記(2)に記載の遺伝子のDNA。

(a) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号73～1251からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号73～1251からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNA。

【0023】

(4) 上記(2)、又は(3)に記載のDNAの細胞内のコピー数が増幅された

ことにより、温度耐性が増強された微生物。

(5) 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする上記(4)に記載の微生物。

【0024】

(6) 上記(4)、又は(5)に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して高い培養温度でも該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

【0025】

(7) 少なくとも上記(2)、又は(3)に記載のDNAを含んだ組換えプラスミド pUCGCS (FERM BP-8217)。

【0026】

(8) 少なくとも配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するDNA断片 (SalI-KpnI断片)、又はそのコーディング領域 (塩基番号73~1251) を含むPCR増幅断片を、(7)のように大腸菌ベクター pT7Blueではなく、例えば、酢酸菌-大腸菌シャトルベクター pMV24にそれぞれ挿入してなる組換えプラスミド pG1、又は pGCS。

【0027】

(9) 組換えプラスミド pG1、又は pGCS をアセトバクター・アセチ (Acetobacter acetii) No. 1023 (FERM BP-2287) に導入してなる形質転換体。

【0028】

本発明によれば、微生物に対して、温度に対する耐性を付与し、増強することができる。そして、アルコール酸化能を有する微生物、特に酢酸菌においては、温度に対する耐性が顕著に向上し、高温下においても酢酸を効率良く蓄積する能力を付与することができる。

【0029】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0030】

(1) 本発明のDNA

本発明のDNAは、温度耐性を向上させる機能を有する配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードし得る塩基配列を包含し、該塩基配列の調整要素、及び該遺伝子の構造部分を含む。更に詳細には、本発明は温度耐性遺伝子に関するものであって、本温度耐性遺伝子は、温度耐性及び／又は温度耐性向上に関与する遺伝子を指し、更に具体的には、少なくとも(i)配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するDNA、又は(ii)それに含まれ、GCSTANパク質をコードする遺伝子(GCS遺伝子)の塩基配列、から選ばれる少なくともひとつを包含するものである。

【0031】

本発明のDNAは、当業者に公知の方法で調製することが出来る。例えば、本明細書において具体的な塩基配列で示されたDNAは、酢酸菌のゲノムを出発原料として用いて、例えば、ショットガン・クローニング法によって調製することができる。その際、断片化された各染色体DNAは、その長さ等に応じて、プラスミドベクター又はファージ等の適当なクローニングベクターに連結し、これを用いてエレクトロポレーション法等の適当な方法によって酢酸菌等の適当な宿主細胞を形質転換し、該断片化各染色体DNAをクローニングする為の、クローンライブラリーを調製することができる。

【0032】

更に、化学分解法(マキシムーギルバート法)及びジデオキシ法等の公知の方法に従って、かかるクローンライブラリーから得られる断片化各染色体DNAの塩基配列を決定することができる。

【0033】

或は、本明細書に記載された本発明DNAの塩基配列又はアミノ酸配列の情報に基づき、当業者に周知の化学合成、又は、本発明のプライマーを使用したPCRにより増幅して調製することもできる。

【0034】

例えば、本発明のDNAは、グルコンアセトバクター・エンタニイ(Gluconacetobacter entanii)の染色体DNAから次のようにして取得することができる

。まず、グルコンアセトバクター・エンタニイ、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) の染色体DNAライブラリーを調製する。なお、染色体DNAは、常法 (例えば、特許文献1参照) により取得する。

【0035】

次に得られた染色体DNAから温度耐性遺伝子を単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間などを調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、*Sau3AI* を温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1~10ユニット/mlで様々な時間 (1分~2時間)、染色体DNAに作用させてこれを消化する。なお、後記実施例では*SalI* と*KpnI* を用いた。

【0036】

次いで、切断された染色体DNA断片を、酢酸菌内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素*SalI* と*KpnI* と相補的な末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えば*SalI* と*KpnI* を温度30℃、酵素濃度1~100ユニット/mlの条件下で、1時間以上ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。

【0037】

次に、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と切断開裂されたベクターDNAを混合し、これにT4 DNAリガーゼを温度4~16℃、酵素濃度1~100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6~24時間作用させて組換えDNAを得る。

【0038】

得られた組換えDNAを用いて、通常は寒天培地上で37℃でしか増殖することのできない酢酸菌、例えばアセトバクター・アセチ1023株 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (FERM BP-2287) を形質転換し、38℃で培養する。生じたコロニーを液体培地に接種して培養し、得られる菌体からプラスミ

ドを回収することで温度耐性遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

【0039】

本発明のDNAとして、具体的には、配列表の配列番号1の塩基配列を有するDNAが挙げられるが、その内、塩基番号73～1251からなる塩基配列はコーディング領域である。

【0040】

配列番号1に示す塩基配列及び配列番号2に示すアミノ酸配列（図3：塩基番号73～1251に対応）は、DDBJ/EMBL/Genbank及びSWISS-PROT/PIRにおいてホモロジー検索をしたところ、アミノ酸配列レベルでメソリゾビウム・ロットイ（*Mesorhizobium loti*）のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子と41%、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子とも39%の相同性を有することが分かったが、いずれも40%程度の低い相同性であり、これらのタンパク質をコードする遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。また、上記のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、温度耐性と関係していることは全く知られていない。

【0041】

また、本発明のDNAは、その塩基配列が明らかとなったので、例えば、鋳型として酢酸菌のゲノムDNAを用い、該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いるポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR反応）（例えば、非特許文献2参照。）によって、または該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーションによっても得ることができる。

【0042】

オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々のDNA合成機を用いて定法に従って合成できる。また、PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社（Applied Biosystems）製のサーマルサイクラーGene Amp PCR System 2400を用い、Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）やKOD-Plus（東洋紡績社製）などを使用して、定法に従って行なうことができる。

【0043】

本発明の温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAは、コードされるタンパク質の温度耐性を増強する機能が損なわれない限り、1又は複数の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたタンパク質をコードするものであっても良い。

【0044】

すなわち、上記した本発明のタンパク質において、それを構成する本発明に係る特定のアミノ酸配列において一部のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列とは、該アミノ酸配列から成るポリペプチドと実質的に同等の機能を有する限りにおいて、好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列、或いはそれらを組み合わせたアミノ酸配列から成るものを意味する。

【0045】

また、本発明において、上記した温度耐性を増強する機能を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されるように塩基配列を改変することによっても取得され得る。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得することができる。

【0046】

なお、上記において、本発明に係るタンパク質を構成する本発明における特定のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、該アミノ酸配列と全アミノ酸配列に亘ってアラインメントして比較した場合に、全体の平均で約30%以上、好ましくは約50%以上、更に好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上のアミノ酸が同一であるようなアミノ酸配列を意味する。従って、本アミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列から成るタンパク質は、本アミノ酸配列から成るタンパク質と実質的に同等の機能（温度耐性増強、向上機能）を有するものと考えられる。

【0047】

また、一般的にタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は

、種間、株間、変異体、変種間でわずかに異なることが知られているので、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、酢酸菌全般、中でもアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の種、株、変異体、変種から得ることが可能である。

【0048】

具体的には、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、又は変異処理したアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、これらの自然変異株若しくは変種から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号73～1251からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、該タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいうストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば1×SSCで0.1%SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件などが挙げられる。

【0049】

ハイブリダイゼーションは、例えば、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al, 1987) に記載の方法等、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添附の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

【0050】

(2) 本発明の酢酸菌

本発明の酢酸菌はアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の細菌を指

し、温度耐性が增強されたアセトバクター属細菌及びグルコンアセトバクター属である。

【0051】

アセトバクター属細菌として具体的には、アセトバクター・アセチ (*Acetobacter aceti*) が挙げられ、アセトバクター・アセチ No. 1023 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (特許生物寄託センターに FERM BP-2287 として寄託) が例示される。

また、グルコンアセトバクター属細菌としては、グルコンアセトバクター・エントニイ (*Gluconacetobacter entanii*) が挙げられ、現在特許生物寄託センターに FERM BP-491 として寄託されているアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株が例示される。

【0052】

温度耐性の增強は、例えば温度耐性遺伝子の細胞内のコピー数を増幅すること、又は、該遺伝子の構造遺伝子を含む DNA 断片をアセトバクター属細菌中で効率よく機能するプロモーター配列に連結して得られる組換え DNA を用いて、アセトバクター属細菌を形質転換することによって增強することができる。

【0053】

また、染色体 DNA 上の該遺伝子のプロモーター配列を、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌中で効率よく機能する他のプロモーター配列、例えば大腸菌のプラスミド pBR322 (宝酒造社製) のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミド pHSG298 (宝酒造社製) のカナマイシン耐性遺伝子、プラスミド pHSG396 (宝酒造社製) のクロラムフェニコール耐性遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子などの各遺伝子のプロモーターなどの酢酸菌以外の微生物由来のプロモーター配列に置き換えることによっても、酢酸耐性を增強することができる。

【0054】

該遺伝子の細胞内コピー数の増幅は、該遺伝子を保持するマルチコピーベクターをアセトバクター属細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。すなわち、該遺伝子を保持するプラスミド、トランスポゾン等をアセトバクター

属やグルコンアセトバクター属の細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

【0055】

マルチコピーベクターとしては、pMV24（例えば、非特許文献3参照）やpTA5001（A）、pTA5001（B）（特許文献1参照）などが挙げられ、染色体組み込み型ベクターであるpMVL1（例えば、非特許文献4参照）も挙げられる。また、トランスポゾンとしては、MuやIS1452などが挙げられる。

【0056】

アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌へのDNAの導入は、塩化カルシウム法（例えば、非特許文献5参照）やエレクトロポレーション法（例えば、非特許文献6参照）等によって行なうことができる。

【0057】

アルコール酸化能を有するアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌において、上記のようにしてその温度耐性を増強すると、酢酸の生産効率を増大させることができる。

【0058】

（3）食酢製造法

上記のようにして、温度耐性遺伝子のコピー数が増幅されたことにより温度耐性が選択的に増強されたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌であって、アルコール酸化能を有するものをアルコール含有培地で培養し、該培地中に酢酸を生産蓄積せしめることにより、食酢を効率よく製造することができる。

【0059】

本発明の製造法における酢酸発酵は、従来の酢酸菌の発酵法による食酢の製造法と同様に行なえば良い。酢酸発酵に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、エタノールを含有し、必要があれば使用菌株が生育に要求する栄養源を適当量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でも良い。

炭素源としては、グルコースやシュクロースをはじめとする各種炭水化物、

各種有機酸が挙げられる。窒素源としては、ペプトン、発酵菌体分解物などの天然窒素源を用いることができる。

【0060】

また、培養は、静置培養法、振とう培養法、通気攪拌培養法等の好氣的条件下で行ない、培養温度は通常 30℃で行なう。培地の pH は通常 2.5～7 の範囲であり、2.7～6.5 の範囲が好ましく、各種酸、各種塩基、緩衝液等によって調製することもできる。通常 1～2 1 日間の培養によって、培地中に高濃度の酢酸が蓄積する。

【0061】

(4) 本発明の実施様態

また、本発明に係る ORF (配列番号 1 において、塩基番号 7～1251: GCS 遺伝子) 又はそれを含有する温度耐性遺伝子 (配列番号 1) の 1 部を大腸菌ベクター (マルチコピーベクター) pT7Blue (Novagen 社製) に挿入してなる組換えプラスミド pUCGCS は、特許生物寄託センターに FERM BP-8217 として寄託されているので、本発明に係る遺伝子の DNA は容易に入手することができ、当業者であれば本発明の実施は容易である。そして、所望するのであれば、この組換えプラスミドを用いて、本発明に係る ORF 又はそれを含有する温度耐性遺伝子を、酢酸菌で自律複製可能なベクターにのせかえ、これを酢酸菌に導入し、これを培養することにより高温条件下においても酢酸発酵が行うことが出来、冷却コストを低減させる事が出来る。

【0062】

更にまた、上記したようにそしてまた後記する実施例からも明らかなように、温度耐性遺伝子源の寄託、PCR 態様、プラスミドベクター、組換えプラスミドの作製、宿主菌の寄託その他があきらかにされており、いずれも入手ないし操作、処理が容易であるので、実施例に従って各操作、処理を行えば、目的とする温度耐性形質転換体を得ることができ、これを使用することにより高温条件下においても酢酸を製造することができる。したがって、この点からしても、本発明の実施は容易である。

【0063】

【実施例】

(実施例 1) グルコンアセトバクター・エンタニイからの温度耐性遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

【0064】**(1) 染色体DNAライブラリーの作製**

グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の 1 株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) を 6 % 酢酸、4 % エタノールを添加した YPG 培地 (3 % グルコース、0.5 % 酵母エキス、0.2 % ポリペプトン) で 30℃ にて振とう培養を行なった。培養後、培養液を遠心分離 (7,500 × g、10 分) し、菌体を得た。得られた菌体より、特開昭 60-9489 号公報に開示された方法により、染色体 DNA を調製した。

【0065】

上記のようにして得られた染色体 DNA 及び大腸菌-酢酸菌シャトルベクター pMV24 を、制限酵素 *Sal*I と *Kpn*I (宝酒造社製) で切断した。これらの DNA を適量ずつ混合し、ライゲーションキット (TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2, 宝酒造社製) を用いて連結してグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体 DNA ライブラリーを構築した。

【0066】**(2) 温度耐性遺伝子のクローニング**

上記のようにして得られたグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体 DNA ライブラリーを、通常は寒天培地上で培養温度 37℃ 程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチ No. 1023 株に形質転換し、100 μg/ml のアンピシリンを含む YPG 寒天培地にて、38℃ で 4 日間培養した。

【0067】

生じたコロニーを 100 μg/ml のアンピシリン含む YPG 培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収したところ、図 1 に示した約 1.6 kb の *Sal*I-*Kpn*I 断片がクローン化されたプラスミドが回収でき、このプラスミドを pG1 と命名した。

このようにして通常は寒天培地上で 37℃ 程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチ No. 1023 株を 38℃ でも増殖可能にする温度耐性遺伝子断片を取得した。

【0068】

(3) クローン化された DNA 断片の塩基配列の決定

上記のクローン化された S a l I - K p n I 断片を大腸菌ベクター p U C 1 9 の S a l I - K p n I 部位に挿入し、該断片の塩基配列を、サンガーのダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって決定した。その結果、配列番号 1 に記載した塩基配列 (図 6) が決定された。配列決定は両方の DNA 鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様にして行なった。

【0069】

配列番号 1 記載の塩基配列中には、塩基番号 73 から塩基番号 1251 にかけて、配列番号 2 に記載したような 393 個のアミノ酸 (図 3) をコードするオープンリーディング・フレーム (O R F) の存在が確認された。

【0070】

(実施例 2) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の温度耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での温度耐性の増強

【0071】

(1) アセトバクター・アセチへの形質転換

上記のようにしてクローン化されたアセトバクター・アルトアセトゲネス MH-24 (Acetobacter altoacetigenes MH-24) 株 (F E R M B P - 4 9 1) 由来の温度耐性遺伝子を含む DNA 断片を、K O D - P l u s - (東洋紡績社製) を用いて P C R 法により増幅し、増幅した DNA 断片を酢酸菌-大腸菌シャトルベクター p M V 2 4 (例えば、非特許文献 3 参照) の制限酵素 S m a I 切断部位に挿入したプラスミド p G C S を作製した。p G C S に挿入された増幅断片の概略を図 1 に示した。この増幅断片は、S a l I - K p n I 断片 (温度耐性向上遺伝子: その塩基配列を配列番号 1 に示す) 内に含まれ、塩基番号 73 ~ 1251 のコーディング領域 (O R F) の上流及び下流領域の一部を包含するものである。

【0072】

PCR法は次のようにして実施した。すなわち、鋳型として上記酢酸菌由来のゲノムDNAを用い、プライマーとしてプライマー1（その塩基配列を配列番号3（図4）に示す）及びプライマー2（その塩基配列を配列番号4（図5）に示す）を用い、下記するPCR条件にてPCR法を実施した。

【0073】

（PCR条件）

94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 2分を1サイクルとして、30サイクルを行なった。

【0074】

このpGCSをアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法（例えば、非特許文献5参照）によって形質転換した。形質転換株は100 μ g/mlのアンピシリンを含むYPG寒天培地上で38℃で培養を行うことにより選択した。

【0075】

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析し、GCS遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

【0076】

（実施例2）グルコンアセトバクター・エンタニイ由来のGCS遺伝子で形質転換した形質転換株の酢酸発酵試験

【0077】

（1）形質転換株の温度耐性

実施例1で得られたプラスミドpGCSを有するアンピシリン耐性の形質転換株について、培養温度を変化させたYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

【0078】

具体的には、2Lのミニジャー（三ツツ理化学工業社製；KMJ-2A）を用

いて、酢酸 1 %、エタノール 4 %、アンピシリン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む 1 L の Y P G 培地にて、400 rpm、0.2vvm の通気攪拌培養を行ない、形質転換株と元株の培地中の酢酸濃度と、各株の生育を 660 nm における吸光度を測定することで比較した。培養温度は初めに 30℃ で、次に 33℃ で酢酸濃度約 3 % まで発酵させ、更に 36℃ まで上げて酢酸濃度を 3 % まで発酵させ、その後、温度を 2℃ ずつ上げて酢酸発酵を実施した。酢酸濃度が 3 % に達した際は、約 100 ml の培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った 100 mL に対して酢酸 1 %、エタノール 4 %、アンピシリン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように 900 ml の Y P G 培地を添加して、温度を上記のように変更の後、再び酢酸発酵を開始させた。

【0079】

その結果、図 2 に示すように、元株アセトバクター・アセチ No. 1023 では 37℃ までしか増殖せず酢酸発酵が行われないのに対して、形質転換株では 38℃ でも増殖して酢酸発酵が可能であり、さらに 40℃ においても増殖が認められる結果が得られ、GCS 遺伝子の温度耐性増強機能が確認できた。

【0080】

【発明の効果】

本発明により、温度耐性に関与する新規な遺伝子が提供され、さらに該遺伝子を用いてより高温条件下での食酢を高効率で製造可能な育種株を取得することができ、該育種株を用いたより高温条件下での食酢を高効率で製造する方法が提供できた。

【0081】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> Mitsukan Group Corporation
<120> Structural gene responsible for high temperature tolerance in acetic acid bacteria, acetic acid bacteria transformed with said gene, and acetic acid fermentation using said transformants.
<130> 6639

<141> 2002-12-9
 <160> 4
 <210> 1
 <211> 1313
 <212> DNA
 <213> Gluconacetobacter entanii
 <400> 1

```

gaagagtgat attacacttc cctgacgccg ttttctaatt tgctccatac gcgggacctt   60
gccggaaaga taatgtctgt tttcaacgct cttgtttcac ccgccggact ggccgcgacc   120
gttgcggtcg ccgggtgcat gcaggcagcg cttggcactt ttctgggtctc gcgtttccgg   180
tggcaggaaa aacgcatgga ccgggcgggtg cccatgcctc cggtttccgt gctcaagccc   240
ctccacggcg atgaaccgct gctggaggaa gcgcttgaaa gcttctgcac gcaggattac   300
ccgcagatgc agatcgtctt tggcgtacag gccgaagacg atgcggcgat cccgatcgta   360
caacggttga tggaacgcca cccggatgtg cagatggaac tggtgattga cccaccttc   420
cacgggctca accgcaagat cggcaacctg atcaacatca tgacgcgcgt gaagcatgat   480
gtcctgggtca tttccgattc ggatatccac gttgcccccg attacctgcg gcatgtgggtg   540
ggcgccatgg tgcccgacaa tgtcggcctg gtcacgacgc tgtacgcggg gctgcccgcg   600
tcatccacgc tgccgcgcct gctggccgca tgccagatca accataactt cctgcccggc   660
gtgatgctgt cactctacct cgggcggcag gactgccttg gggcgacaat ggcgctgcgg   720
cgttccatgc tggacgaaat cggcgggctg gaagccctcg tgccgcatgt ggccgatgat   780
gcgatactgg gccgttacgt gcgtgaccgt ggcaaggata tcgccattgc cgcgtgcatg   840
acctggacca ccgtgggcga gacctgatg cgtgaggtgc tggcgcatga actgcgctgg   900
ggccggaccg tcaagacgct ggagcctgcg ggttatgccg catccgccat ccagctgccc   960
ctgttctggg ccagcgtcgc cgtgcttgcc gcgccgatg cgacctggac atggtccttc  1020
tttcttgggtg catggggatg gcgggccgtg tgttccttca tcctggaccg tacgtggcg   1080
caacgtagtc tggtgctgcc gtcactgctt ctgccactgc gcgactggat ctcggccgcc   1140
gtcatggtgg gcagtgtcac tggcacgcgg gttgcatggc gtgggcagac aatgcatgtc   1200
acgccccatt cggatcatgac accacgatcg caaccggctt ccccggtga ctgaccgcc   1260
gtcagcagggc tgaactgctt gagaattcca accctgtcgt taataagaac ggg       1313
  
```

<210> 2
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> Gluconacetobacter entanii
 <400> 2

Met Ser Val Phe Asn Ala Leu Val Ser Pro Ala Gly Leu Ala Ala Thr
 5 10 15
 Val Ala Val Ala Gly Cys Met Gln Ala Ala Leu Gly Thr Phe Leu Val
 20 25 30
 Ser Arg Phe Arg Trp Gln Glu Lys Arg Met Asp Arg Ala Val Pro Met
 35 40 45
 Pro Pro Val Ser Val Leu Lys Pro Leu His Gly Asp Glu Pro Leu Leu
 50 55 60
 Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Cys Thr Gln Asp Tyr Pro Gln Met Gln
 65 70 75 80
 Ile Val Phe Gly Val Gln Ala Glu Asp Asp Ala Ala Ile Pro Ile Val
 85 90 95
 Gln Arg Leu Met Glu Arg His Pro Asp Val Gln Met Glu Leu Val Ile
 100 105 110
 Asp Pro Thr Phe His Gly Leu Asn Arg Lys Ile Gly Asn Leu Ile Asn
 115 120 125
 Ile Met Thr Arg Val Lys His Asp Val Leu Val Ile Ser Asp Ser Asp
 130 135 140
 Ile His Val Ala Pro Asp Tyr Leu Arg His Val Val Gly Ala Met Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Asn Val Gly Leu Val Thr Thr Leu Tyr Ala Gly Leu Pro Ala
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Pro Arg Leu Leu Ala Ala Cys Gln Ile Asn His Asn
 180 185 190

Phe Leu Pro Gly Val Met Leu Ser Leu Tyr Leu Gly Arg Gln Asp Cys
 195 200 205
 Leu Gly Ala Thr Met Ala Leu Arg Arg Ser Met Leu Asp Glu Ile Gly
 210 215 220
 Gly Leu Glu Ala Leu Val Pro His Val Ala Asp Asp Ala Ile Leu Gly
 225 230 235 240
 Arg Tyr Val Arg Asp Arg Gly Lys Asp Ile Ala Ile Ala Ala Cys Met
 245 250 255
 Thr Trp Thr Thr Val Gly Glu Thr Ser Met Arg Glu Val Leu Ala His
 260 265 270
 Glu Leu Arg Trp Gly Arg Thr Val Lys Thr Leu Glu Pro Ala Gly Tyr
 275 280 285
 Ala Ala Ser Ala Ile Gln Leu Pro Leu Phe Trp Ala Ser Val Ala Val
 290 295 300
 Leu Ala Ala Pro His Ala Thr Trp Thr Trp Ser Phe Phe Leu Gly Ala
 305 310 315 320
 Trp Gly Trp Arg Ala Val Cys Ser Phe Ile Leu Asp Arg Thr Leu Ala
 325 330 335
 Gln Arg Ser Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Leu Pro Leu Arg Asp Trp
 340 345 350
 Ile Ser Ala Ala Val Met Val Gly Ser Val Thr Gly Thr Arg Val Ala
 355 360 365
 Trp Arg Gly Gln Thr Met His Val Thr Pro His Ser Val Met Thr Pro
 370 375 380
 Arg Ser Gln Pro Ala Ser Pro Gly Asp
 385 390 393
 <210> 3
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gaagagtgat attacacttc cctgacgccg

30

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

cccgttctta ttaacgacag ggttgg

26

【図面の簡単な説明】

【図 1】

制限酵素 S a l I と K p n I を用いてクローニングされたグルコンアセトバクター・エンタニイ由来の遺伝子断片 (p G 1) の制限酵素地図と G C S 遺伝子の位置、及び p G C S への挿入断片の概略図。

【図 2】

G C S 遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の酢酸発酵経過を示す図面。

【図 3】

G C S 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。

【図 4】

プライマー 1 を示す。

【図 5】

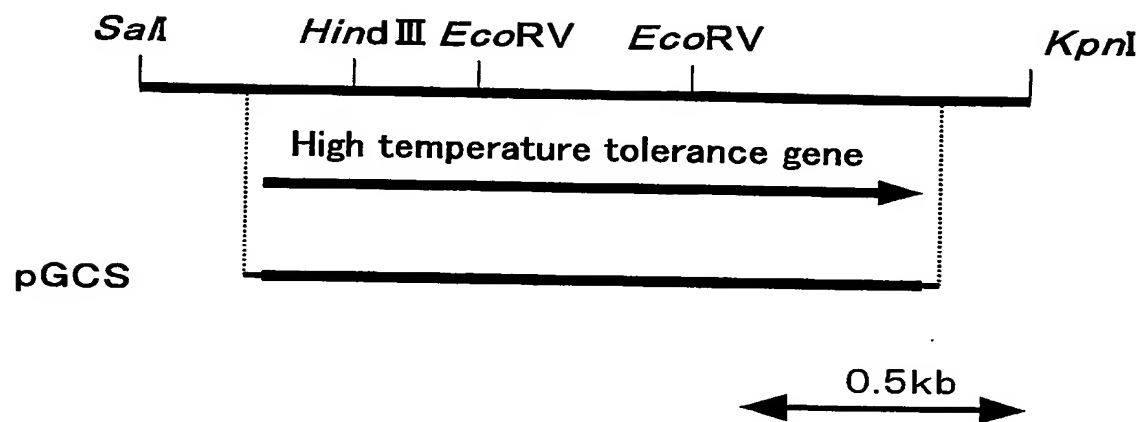
プライマー 2 を示す。

【図 6】

本温度耐性遺伝子の塩基配列 (配列番号 1) を示す。

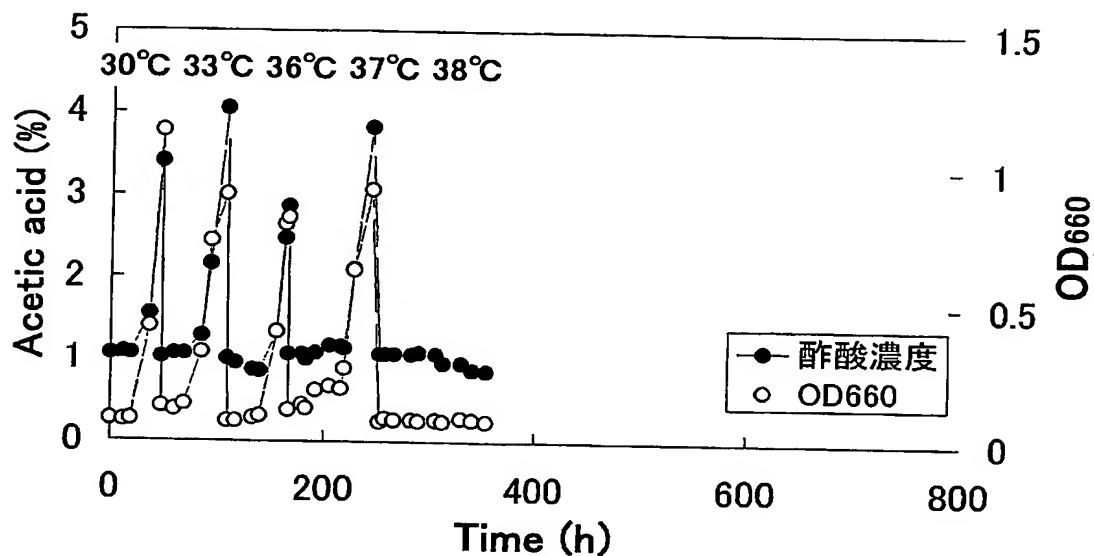
【書類名】 図面

【図 1】

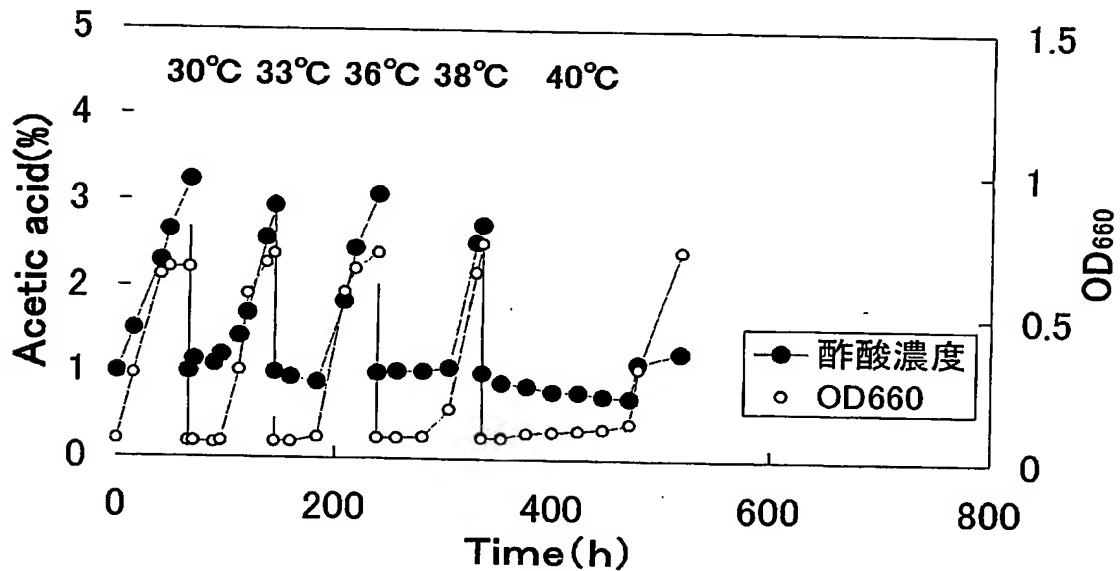


【図 2】

元株の発酵経過



形質転換株の発酵経過



【図 3】

MetSerValPheAsnAlaLeuValSerPro AlaGlyLeuAlaAlaThrValAlaValAla 20
 GlyCysMetGlnAlaAlaLeuGlyThrPhe LeuValSerArgPheArgTrpGlnGluLys 40
 ArgMetAspArgAlaValProMetProPro ValSerValLeuLysProLeuHisGlyAsp 60
 GluProLeuLeuGluGluAlaLeuGluSer PheCysThrGlnAspTyrProGlnMetGln 80
 IleValPheGlyValGlnAlaGluAspAsp AlaAlaIleProIleValGlnArgLeuMet 100
 GluArgHisProAspValGlnMetGluLeu ValIleAspProThrPheHisGlyLeuAsn 120
 ArgLysIleGlyAsnLeuIleAsnIleMet ThrArgValLysHisAspValLeuValIle 140
 SerAspSerAspIleHisValAlaProAsp TyrLeuArgHisValValGlyAlaMetVal 160
 ProAspAsnValGlyLeuValThrThrLeu TyrAlaGlyLeuProAlaSerSerThrLeu 180
 ProArgLeuLeuAlaAlaCysGlnIleAsn HisAsnPheLeuProGlyValMetLeuSer 200
 LeuTyrLeuGlyArgGlnAspCysLeuGly AlaThrMetAlaLeuArgArgSerMetLeu 220
 AspGluIleGlyGlyLeuGluAlaLeuVal ProHisValAlaAspAspAlaIleLeuGly 240
 ArgTyrValArgAspArgGlyLysAspIle AlaIleAlaAlaCysMetThrTrpThrThr 260
 ValGlyGluThrSerMetArgGluValLeu AlaHisGluLeuArgTrpGlyArgThrVal 280
 LysThrLeuGluProAlaGlyTyrAlaAla SerAlaIleGlnLeuProLeuPheTrpAla 300
 SerValAlaValLeuAlaAlaProHisAla ThrTrpThrTrpSerPhePheLeuGlyAla 320
 TrpGlyTrpArgAlaValCysSerPheIle LeuAspArgThrLeuAlaGlnArgSerLeu 340
 ValLeuProSerLeuLeuLeuProLeuArg AspTrpIleSerAlaAlaValMetValGly 360
 SerValThrGlyThrArgValAlaTrpArg GlyGlnThrMetHisValThrProHisSer 380
 ValMetThrProArgSerGlnProAlaSer ProGlyAsp 393

【図 4】

5' - GAAGAGTGATATTACACTTCCCTGACGCCG - 3'

【図 5】

5' - CCCGTTCTTATTAACGACAGGGTTGG - 3'

【図 6】

gaagagtgat attacacttc cctgacgccg ttttctaatt tgctccatac gcggggacctt 60
gccggaaaga taatgtctgt tttcaacgct cttgtttcac ccgccggact ggccgcgacc 120
gttgcggtcg ccgggtgcat gcaggcagcg cttggcactt ttctgggtctc gcgtttccgg 180
tggcaggaaa aacgcatgga ccggggcggtg cccatgcctc cggtttccgt gctcaagccc 240
ctccacggcg atgaaccgct gctggaggaa gcgcttgaaa gcttctgcac gcaggattac 300
ccgcagatgc agatcgtctt tggcgtagag gccgaagacg atgcggcgat cccgatcgta 360
caacggttga tggaacgcca cccggatgtg cagatggaac tgggtgattga cccaccttc 420
cacgggctca accgcaagat cggcaacctg atcaacatca tgacgcgcgt gaagcatgat 480
gtcctgggtca tttccgattc ggatatccac gttgcccccg attacctgcg gcatgtggtg 540
ggcgccatgg tgcccagaaa tgtcggcctg gtcacgacgc tgtacgcggg gctgcccgcg 600
tcattcacgc tgccgcgcct gctggccgca tgccagatca accataactt cctgcccggc 660
gtgatgctgt cactctacct cgggcggcag gactgccttg gggcgacaat ggcgctgcgg 720
cgttccatgc tggacgaaat cggcgggctg gaagccctcg tgccgcatgt ggccgatgat 780
gcgatactgg gccgttacgt gcgtgaccgt ggcaaggata tcgccattgc cgcgtgcatg 840
acctggacca ccgtgggcga gacctcgatg cgtgaggtgc tggcgcatga actgcgctgg 900
ggccggaccg tcaagacgct ggagcctgcg gggttatgcc catccgccat ccagctgccc 960
ctgttctggg ccagcgtcgc cgtgcttgcc gcgccgcatg cgacctggac atggtccttc 1020
tttcttggtg catggggatg gcgggcccgtg tgttccttca tcctggaccg tacgctggcg 1080
caacgtagtc tgggtgctgcc gtcactgctt ctgccactgc gcgactggat ctcggcgcc 1140
gtcatgggtg gcagtgctac tggcacgcgg gttgcatggc gtgggcagac aatgcatgtc 1200
acgccccatt cggtcatgac accacgatcg caaccggctt ccccggtga ctgaccgcc 1260
gtcagcaggc tgaactgctt gagaattcca accctgtcgt taataagaac ggg 1313



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酢酸菌に属する微生物由来の温度耐性に関与する新規な遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の温度耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の温度耐性を向上させる方法、さらに温度耐性が向上した酢酸菌を用いて、より効率良く製造する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 酢酸菌の染色体DNAライブラリーを構築し、このライブラリーより通常は増殖できない温度で増殖を可能にさせる遺伝子を取得する方法によって、実際に食酢製造に用いられているグルコンアセトバクター属の酢酸菌から、温度耐性を実用レベルで向上させる機能を有する温度耐性に関与する新規な遺伝子をクローニングした。また、該遺伝子をプラスミドベクターに連結して酢酸菌に形質転換しコピー数を増幅させた形質転換株においては、顕著に温度耐性が向上し、その結果、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、高温条件下での酢酸発酵能力を顕著に向上させることを可能とした。

【選択図】 なし

特願 2002-356844

ページ： 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[398065531]

1. 変更年月日

1998年10月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県半田市中村町2丁目6番地

氏 名

株式会社ミツカングループ本社